

1 株巨大芽孢杆菌 BM05 发酵条件的优化

刘露¹, 边巴穷达², 闫洪雪¹, 张鹏鹏¹, 梁文辉³, 李丽¹, 赵宏涛³ (1. 海藻活性物质国家重点实验室, 山东青岛 266400; 2. 西藏自治区日喀则市桑珠孜区农牧局, 西藏日喀则 857000; 3. 青岛明月蓝海生物科技有限公司, 山东青岛 266400)

摘要 [目的]优化巨大芽孢杆菌 BM05 的发酵条件, 提高其发酵活菌数。[方法]通过单因素试验筛选最佳碳、氮源, 通过正交试验筛选最佳 C/N 比, 并研究 pH、发酵温度、接种量和转速对发酵的影响。[结果]碳源选用玉米淀粉和葡萄糖, 氮源选择牛肉粉, 初始 pH 7.0, 发酵温度 35 ℃, 接种量为 4%, 转速 220 r/min 为最佳发酵条件。通过发酵条件优化, 发酵菌数达 4.73×10^9 cfu/mL, 比原始配方提高了 1.56 倍。[结论]优化后的发酵条件大大提高了巨大芽孢杆菌 BM05 的发酵活菌数。

关键词 巨大芽孢杆菌; 配方优化; 正交试验

中图分类号 Q939.96 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)21-024-03

Optimization of Fermentation Condition of *Bacillus megaterium* BM05

LIU Lu¹, Penpa Chungdak², YAN Hong-xue¹ et al (1. State Key Laboratory of Bioactive Seaweed Substances, Qingdao, Shandong 266400; 2. Agriculture and Animal Husbandry Bureau of Shigatse Sangzhuji Area in Tibet Autonomous Region, Shigatse, Tibet 857000)

Abstract [Objective] To optimize the fermentation condition of *Bacillus megaterium* BM05, and to enhance the fermented bacterial count. [Method] The optimal carbon source and nitrogen source were selected by single factor test, while the optimal carbon-nitrogen ratio was selected by orthogonal test. And the pH, fermentation temperature, inoculation quantity and rotation speed were also studied. [Result] Corn starch and glucose were the optimal carbon source and beef powder was the optimal nitrogen source. The optimal fermentation conditions were initial pH 7.0, 35 ℃ temperature, 4% inoculation quantity and 220 r/min rotation speed. *Bacillus megaterium* BM05 reached 4.73×10^9 cfu/mL after the optimization of fermentation condition, which was 1.56 times higher than the control. [Conclusion] The optimized fermentation condition greatly enhances the fermented bacterial count of *Bacillus megaterium* BM05.

Key words *Bacillus megaterium*; Formulation optimization; Orthogonal test

解磷微生物可将土壤中的难溶性磷酸盐转化为植物可吸收的物质^[1], 从而促进作物生长发育。巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 是农业上常用的解磷微生物, 俗称“大芽孢”磷细菌^[2], 具有显著的解磷功效^[3], 是生产生物有机肥和微生物菌剂的常用菌种^[4]。巨大芽孢杆菌 BM05 具有解磷作用, 笔者通过单因素试验和正交试验对菌株的发酵培养基及发酵条件进行了优化, 以期提高巨大芽孢杆菌 BM05 的发酵活菌数, 同时降低生产成本。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 巨大芽孢杆菌 BM05 由海藻活性物质国家重点实验室保藏。

1.1.2 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)、YXQ-LS-70A 型高压蒸汽灭菌锅(江苏太仓市试验设备厂)、THZ-D 型摇床(江苏太仓市试验设备厂)和 LRH-150B 型培养箱(广东韶关市泰宏医疗器械有限公司)。

1.1.3 培养基 种子培养基: 酵母粉 6.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 葡萄糖 6.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, pH 7.0。原始发酵培养基: 麦芽糊精 10.0 g/L, 豆饼粉 10.0 g/L, 葡萄糖 5.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, MnSO₄ 0.2 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, CaCO₃ 1.0 g/L, pH 7.0。

1.2 方 法

1.2.1 不同碳源对菌数的影响试验 选用不同的碳源: 麦芽糊精、糖蜜液、蔗糖、甘露醇、玉米淀粉和玉米粉, 浓度均为

10.0 g/L, 配方中其他成分同原始发酵培养基。接种量为 2%, 250 mL 摇瓶装液量为 50 mL, 摇床 32 ℃、180 r/min 振荡培养, 完全转芽孢后利用涂平板计数法^[5]测定发酵液中菌数, 比较不同碳源对发酵活菌数的影响。

1.2.2 不同氮源对菌数的影响试验 选用不同的氮源: 豆饼粉、蛋白胨、脱脂豆粉、酵母粉、牛肉粉和玉米浆, 浓度均为 10.0 g/L, 配方中其他成分同原始发酵培养基。培养条件不变。利用涂平板计数法测定发酵液中菌数, 比较不同氮源对发酵液中菌数的影响。

1.2.3 不同 C/N 比对菌数的影响试验 以玉米淀粉、葡萄糖和牛肉粉作为因素, 每个因素设 3 个水平, 利用 SPSS17.0 软件设计试验, 进一步优化发酵培养基中碳、氮源的浓度。培养基的其他成分同原始发酵培养基, 培养条件不变。

1.2.4 初始 pH 对菌数的影响试验 选择初始 pH 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 和 9.0, 其他发酵条件为: 温度 32 ℃, 接种量 2%, 转速 180 r/min。

1.2.5 发酵温度对菌数的影响试验 发酵温度选择 27、29、31、33、35、37 和 39 ℃, 初始 pH 7.0, 接种量为 2%, 转速 180 r/min。

1.2.6 接种量对菌数的影响试验 接种量选择 2%、4%、6%、8% 和 10%, 发酵温度为 35 ℃, 初始 pH 7.0, 转速为 180 r/min。

1.2.7 转速对菌数的影响试验 转速选择 140、160、180、200、220 和 240 r/min, 接种量为 4%, 发酵温度为 35 ℃, 初始 pH 7.0。

1.2.8 新配方在发酵罐上的稳定性考察 分别将原始配方、最优配方及发酵条件在 10 L 发酵罐中(装液量为 6 L)进行生产水平评估, 设 3 次重复试验, 考察优化配方的稳定性。

作者简介 刘露(1987-), 女, 山东济南人, 工程师, 硕士, 从事微生物应用研究。

收稿日期 2016-05-31

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌数的影响 由图 1 可知,以玉米淀粉为碳源时,菌数明显比其他碳源高,所以选择玉米淀粉为碳源。

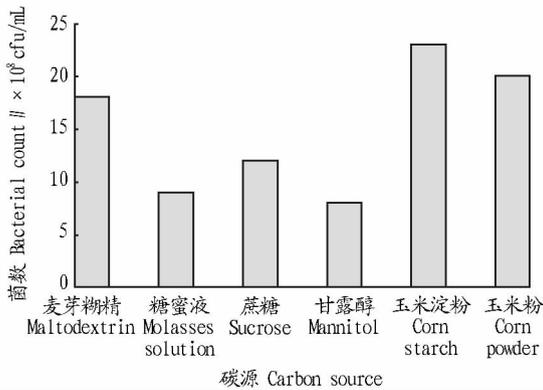


图 1 不同碳源对菌数的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on the bacterial count

2.2 不同氮源对菌数的影响 由图 2 可知,以牛肉粉为氮源时,菌数明显比其他氮源高,所以选择牛肉粉为氮源。

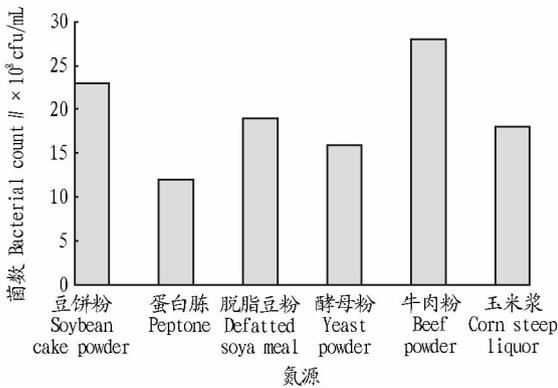


图 2 不同氮源对菌数的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen sources on the bacterial count

2.3 不同 C/N 比对菌数的影响 由表 1、2 可知,各因子对活菌数的影响大小顺序为牛肉粉、葡萄糖、玉米淀粉。最佳培养基组分为玉米淀粉 10.0 g/L,葡萄糖 6.0 g/L,牛肉粉 15.0 g/L。

表 1 不同 C/N 比对菌数影响的正交试验设计及结果

Table 1 Design of orthogonal test on effects of C/N ratio on the bacterial count

| 处理 Treatment | 因素 Factor | | | 菌数 Bacterial count $\times 10^8$ cfu/mL |
|-----------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|---|
| | 玉米淀粉 Corn starch g/L | 葡萄糖 Glucose g/L | 牛肉粉 Beef powder g/L | |
| 1 | 20 | 6 | 10 | 17 |
| 2 | 10 | 5 | 20 | 26 |
| 3 | 20 | 4 | 20 | 29 |
| 4 | 10 | 6 | 15 | 37 |
| 5 | 15 | 6 | 20 | 28 |
| 6 | 20 | 5 | 15 | 36 |
| 7 | 15 | 5 | 10 | 21 |
| 8 | 15 | 4 | 15 | 33 |
| 9 | 10 | 4 | 10 | 18 |

2.4 初始 pH 对菌数的影响 由图 3 可知,随着 pH 的增加,菌数呈先增加后降低的趋势;当 pH 为 7.0 时,巨大芽孢

杆菌 BM05 芽孢整齐且菌数最高。

表 2 不同 C/N 比对菌数影响的正交试验结果

Table 2 Result of orthogonal test on effects of C/N ratio on the bacterial count

| 因素 Factor | 均方 Mean square | F 值 F value | P > F |
|------------------|-------------------|----------------|-------|
| 玉米淀粉 Corn starch | 0.111 | 0.011 | 0.989 |
| 葡萄糖 Glucose | 0.778 | 0.077 | 0.929 |
| 牛肉粉 Beef powder | 208.778 | 20.648 | 0.046 |

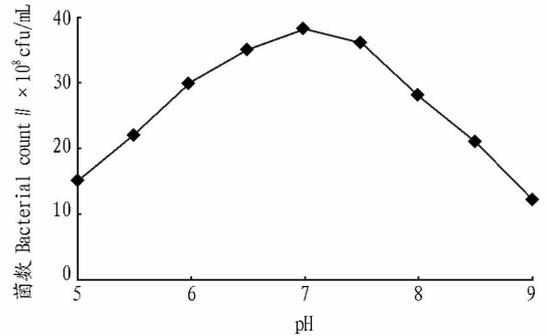


图 3 不同 pH 对菌数的影响

Fig. 3 Effects of pH value on the bacterial count

2.5 发酵温度对菌数的影响 由图 4 可知,随着温度升高,菌数呈先增加后降低的趋势;当温度为 35 °C 时,菌数最高。

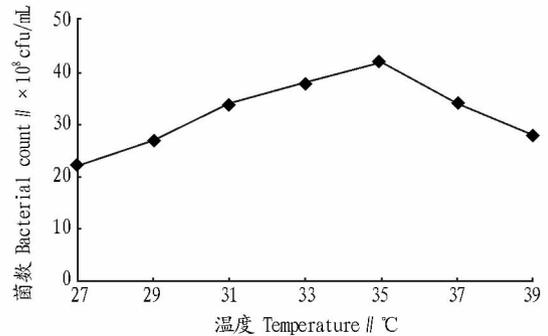


图 4 不同温度对菌数的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the bacterial count

2.6 接种量对菌数的影响 由图 5 可知,当接种量为 2% 时,发酵时延迟期时间较长,且总发酵时间长;当接种量为 4% 时,芽孢整齐,发酵菌数最高,接种量越高,延迟期越短,但发酵菌数越低,所以选择接种量为 4%。

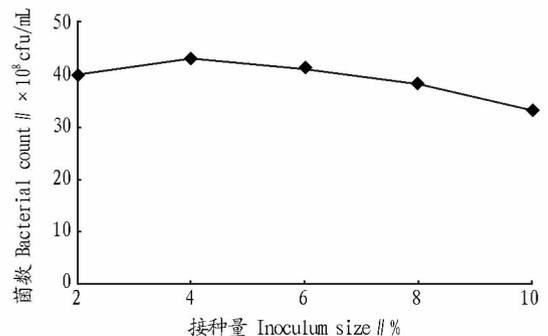


图 5 不同接种量对菌数的影响

Fig. 5 Effects of inoculum size on the bacterial count

2.7 转速对菌数的影响 由图6可知,当转速为220 r/min时,发酵活菌数最高,所以最佳发酵转速设为220 r/min。

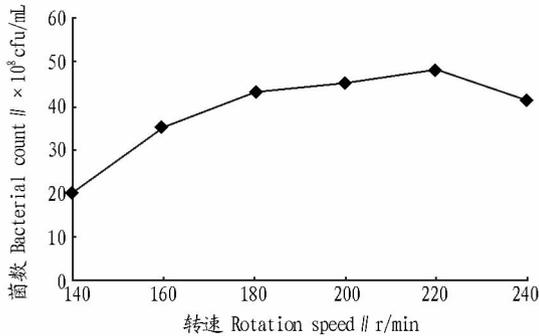


图6 不同转速对菌数的影响

Fig.6 Effects of rotation speed on the bacterial count

2.8 新配方在发酵罐上的稳定性 通过上述试验,最优配方为:玉米淀粉10.0 g/L,葡萄糖6.0 g/L,牛肉粉15.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L, K_2HPO_4 2.0 g/L, MnSO_4 0.2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, CaCO_3 1.0 g/L, pH 7.0。发酵条件为:发酵温度35 ℃,接种量4%,转速220 r/min。

将原始配方和新配方分别在10 L发酵罐上发酵。原始配方发酵30 h转芽孢,芽孢率达90%,菌数为 1.85×10^9 cfu/mL;新配方进行3次发酵试验,发酵稳定,发酵28 h转芽孢,芽孢率在95%以上,菌数为 4.73×10^9 cfu/mL,提高了1.56倍。

3 结论与讨论

试验结果表明,巨大芽孢杆菌BM05的最优发酵配方为:玉米淀粉10.0 g/L,葡萄糖6.0 g/L,牛肉粉15.0 g/L,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L, K_2HPO_4 2.0 g/L, MnSO_4 0.2 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, CaCO_3 1.0 g/L。发酵起始pH为7.0,发酵温度35 ℃,接种量4%,转速220 r/min。通过发酵罐试验,发酵菌数从原始配方的 1.85×10^9 cfu/mL提高到 4.73×10^9 cfu/mL,提高了1.56倍。

巨大芽孢杆菌BM05配方中采用2种碳源和2种氮源共用的形式,葡萄糖和硫酸铵可缩短延迟期,玉米淀粉和牛肉粉的加入可供后期菌的生长繁殖,且成本较低,通过正交试验合理了碳氮的比例,达到使BM05生长的最优水平。

对巨大芽孢杆菌发酵条件的优化,李丽等^[6]采用测OD的方式检测菌生长量,该研究直接采用测活菌数,结果更准确。通过配方优化,发酵活菌数明显高于其他巨大芽孢杆菌^[7-9],为巨大芽孢杆菌菌肥的工厂化生产提供了基础数据。

参考文献

- [1] 吴鹏飞,张冬梅,郝丽红,等.解磷微生物研究现状与展望[J].中国农业科技导报,2008,10(3):40-46.
- [2] 李卓棣,喻子牛,何绍江.磷细菌的分离与纯化[M]//农业微生物学实验技术.北京:中国农业出版社,1995:90-92.
- [3] 郑传进,黄林,龚明.巨大芽孢杆菌解磷能力的研究[J].江西农业大学学报,2002,24(2):190-192.
- [4] 沈德龙,李俊,姜昕.我国微生物肥料产业现状及发展方向[J].微生物学杂志,2013,33(3):1-4.
- [5] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2010:28-34.
- [6] 李丽,刘露,闫红雪,等.一株巨大芽孢杆菌及其发酵培养基的优化[J].现代农业科技,2015(24):202-204,216.
- [7] 王继雯,刘莹莹,李冠杰,等.巨大芽孢杆菌C2产芽孢培养条件的优化[J].中国农学通报,2014(36):155-160.
- [8] 郭晓军,李潞滨,李术娜,等.毛竹枯梢病拮抗细菌巨大芽孢杆菌6-59菌株的产芽孢条件优化[J].植物保护学报,2008,35(5):443-447.
- [9] 饶舜,王亚平,李娜,等.巨大芽孢杆菌发酵培养基的优化[J].湖北农业科学,2014,53(15):3539-3542.
- [10] 赛世杰.MBR脱氮除磷工艺在城市污水处理中的工程应用研究[D].北京:清华大学,2011.
- [11] 吴湘.漂浮栽培植物对富营养化水体中磷的去除效应基因型差异及原因分析[D].杭州:浙江大学,2008.
- [12] TANG B, QIU B. Distribution and mass transfer of dissolved oxygen in a multi-habitat membrane bioreactor [J]. Bioresource technology, 2015 (2): 323-328.
- [13] 王锐刚.活性污泥法除磷动力学研究[D].徐州:中国矿业大学,2009.
- [14] 刚卯.A²/O₃污水处理工艺过程中磷的赋存形态及除磷机理的研究[D].昆明:昆明理工大学,2012.
- [15] 杜加春.菹草根际环境磷迁移转化研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2012.
- [16] 黄霞,曹斌,文湘华,等.膜-生物反应器在我国的研究与应用新进展[J].环境科学学报,2008,28(3):416-432.
- [17] 李森.查干湖低温期内源磷的释放及其对富营养化的影响[D].长春:吉林大学,2013.
- [18] 严杰能,许燕滨,段晓军,等.胞外聚合物的提取与特性分析研究进展[J].科技导报,2009,27(20):106-110.
- [19] 李晶.强化脱氮除磷实验研究[D].合肥:安徽建筑大学,2015.
- [20] STEPHENS H L, STENSEL H D. Effect of operating conditions on biological phosphorus removal [J]. Water environment research, 1998, 70: 362-369.
- [21] 刘立.反硝化聚磷菌快速富集、培养及鉴别[D].广州:广东工业大学,2013.
- [22] 李金娟.活性污泥利用挥发性脂肪酸储存聚羟基脂肪酸酯的研究[D].天津:天津大学,2010.
- [23] 成英俊.膜生物反应器脱氮除磷功能强化研究[D].大连:大连理工大学,2004.
- [24] 曹斌,黄霞,北中郭,等.A²/O₃-膜生物反应器强化生物脱氮除磷中试研究[J].中国给水排水,2007(2):22-26.
- [25] 葛艳辉.强化生物除磷系统除磷效果及微生物群落结构分析[D].天津:天津大学,2012.
- [26] 丘继彩.生活污水化学除磷试验研究[D].济南:山东大学,2007.
- [27] 李楠.生物除磷影响因素的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2006.
- [28] 张捍民,成英俊,肖景亮,等.序批式膜生物反应器脱氮除磷性能研究[J].大连理工大学学报,2005(1):22-25.
- [29] 汤桂兰.水体中磷的生物去除技术研究[D].合肥:安徽农业大学,2005.
- [30] 方治国,孙培德,钟晓,等.强化生物除磷系统微生物群落结构对水温变化响应的试验研究[J].环境科学学报,2011(5):941-947.
- [31] 赵曙光,姜志琛,徐东耀,等.新型一体化A²/O₃-MBR曝气能效研究[J].水处理技术,2014(12):79-82.
- [32] 李军,彭永臻.序批式生物膜法反硝化除磷特性及其机理[J].中国环境科学,2004,24(2):219-223.
- [33] 曹雪梅.A²/O₃工艺反硝化除磷的实现及性能的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2007.
- [34] 汪林.反硝化同步除磷动力学原理及其在改善MSBR性能中的应用[D].重庆:重庆大学,2010.
- [35] 白玲,蓝伟光,王金保,等.废水处理中膜生物反应器的研究进展[J].膜科学与技术,2008(2):91-96.
- [36] 吴鹏,陆爽君.ABR- MBR一体化工艺节能降耗措施优化研究[J].环境科学,2015(8):2934-2938.